

## ⑫ 公開特許公報 (A) 平3-255096

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 07 K 13/00

識別記号

序内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)11月13日

7731-4H  
8717-4B  
7236-4BC 12 N 15/00  
5/00A  
B\*

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全18頁)

⑮ 発明の名称 組換ラット肝実質細胞増殖因子

⑯ 特願 平2-50643

⑯ 出願 平2(1990)3月1日

特許法第30条第1項適用 平成元年9月20日、日本癌学会発行の「日本癌学会総会記事」に発表

⑰ 発明者 中村 敏一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号  
 ⑰ 発明者 西澤 勉 神奈川県相模原市富士見3丁目3-607  
 ⑰ 発明者 関 達也 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内  
 ⑰ 発明者 下西 学 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内  
 ⑰ 出願人 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号  
 ⑰ 出願人 中村 敏一 福岡県福岡市東区みどりヶ丘3丁目11番6号  
 ⑰ 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

## 明細書

## 1. 発明の名称

組換ラット肝実質細胞増殖因子

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 組換ラット肝実質細胞増殖因子。
- (2) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を含有するDNA。
- (3) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクター。
- (4) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体。
- (5) ラット肝実質細胞増殖因子をコードする塩基配列を発現し得る組換発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、該培養液から組換ラット肝実質細胞増殖因子を採取することを特徴とする組換ラット肝実質細胞増殖因子の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は肝実質細胞増殖活性を有するポリペプ

チド、さらに詳しく述べては、生体外 (in vitro) で肝実質細胞の姦性、増殖を可能にする生理活性を有する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、組換発現ベクター、形質転換体、および該ポリペプチドの製造法に関するものである。

本発明のポリペプチドは肝実質細胞培養試験、肝再生促進剤、肝機能の基礎的研究、成熟肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究、肝癌の発癌研究用、さらには該ポリペプチドに対する抗体を用いる臨床診断試験などへの利用が期待出来る。

## 〔従来の技術〕

従来、細胞増殖活性を有するポリペプチドとして、上皮細胞増殖因子 (EGF)、結芽芽細胞増殖因子 (FGF)、神経細胞増殖因子 (NGF)、血小板出来増殖因子 (PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (ECGF) などが知られている。これらの細胞増殖因子の他に、生体外において成熟肝実質細胞増殖活性を有するポリペプチドが 198

4年に中村らによって再生肝ラット血清より部分精製され、肝実質細胞増殖因子（以下HGFと呼ぶ）と命名された。

このHGFの発見まで肝実質細胞は、各種の増殖細胞が活発に増殖する哺乳動物血清の存在下でも該細胞の増殖が全く認められず、通常約1週間で培養容器の壁からの脱層が起こり、生体外での長期培養は不可能であった。しかし、このHGFの存在下において肝細胞は極めて良好に増殖し、該細胞の培養が可能となった（Biochem. Biophys. Res. commun., 122, 1450, 1984）。他の研究者によると、このHGF活性は、肝部分切除手術後の血中、劇症肝炎患者の血中にも存在することが確認された。その後、多くの研究者によって精製性、化学的性質、生物学的性質が明らかにされたが、このHGFあるいはHGFと同様の肝細胞増殖活性を有するポリペプチドのアミノ酸構造を同定するまでは至らなかった。

このような状況の下で、本発明者らは、ラット血小板などの組織からHGFを分離精製して研究

を重ね、この血小板由来のHGFは、2種のサブユニットからなり、生体外において肝実質細胞を極めて良好に増殖させることを見出した。そしてこのHGFに含有される一部のアミノ酸配列27残基を同定することに成功した（特願昭63-21650号公報）。

【発明が解決しようとする課題】

生体内HGFは、肝臓、腎、肺臓、骨臓、ひ臍、胎盤、腎臓などの臓器あるいは血小板や白血球などの血球細胞などから種々量分泌されるポリペプチドであるため、原材料組織の入手、収量、安定供給など問題点が多い。このHGFを肝実質細胞の培養や肝細胞の研究用として利用するためには、その構造を明らかにしHGFあるいはHGFと同様な活性を有するポリペプチドを遺伝子組換技術を応用して大量に供給することが望まれている。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく脱脂研究を重ねた結果、ラット肝臓mRNAより調製したcDNAライブラリーより、ラット血小板由来の

HGFのアミノ酸配列に基づいて合成したオリゴスクレオチドをプローブとして用い、ラットHGFポリペプチドをコードする塩基配列を含有するcDNAが得られることを見出した。さらに、該cDNAを含有する組換発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞を用い、該形質転換細胞を培養してラットHGF遺伝子が発現することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は組換ラットHGF、ラットHGFをコードする塩基配列を含有するcDNA、該cDNAを発現し得る動物用ベクター、および該組換発現ベクターで、これらを用いた動物由来のHGF遺伝子を組換化すること、該遺伝子が動物由来のHGFを発現することである。

本発明で用いたラットHGF遺伝子は、前記組換発現ベクター、および組換動物由来は、例えば次のようにして調製する。

すなわち、組み立てる組合せ、あるいは組合せの動物組織由来のRNAまたは染色体DNAを単離し、次法に従ってcDNAライブラリーまたは

染色体DNAライブラリーを作製し、(2)標識した合成オリゴスクレオチドプローブ、あるいは適切な標識したcDNAプローブを用いて、上記ラット由来cDNAライブラリーまたは染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローニングより目的とする1種または2種以上のcDNAまたは染色体DNAを抽出する。また、本発明によって明らかにされたDNA配列あるいはヒトや動物のHGFのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴスクレオチドを本発明により得られたラットHGF cDNAやラットHGF染色体DNAなどをプローブに用い、またヒト又は動物のHGFに対する抗体を用い、直接ラットの臓器あるいは正常細胞などから抽出したmRNAを標識したcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、単離されたクローニングより目的とするラット由来のHGFのcDNAを抽出することもできる。またこのラット由来HGFのcDNAよりラットHGFをコードするcDNA断片を制限酵素を用いて切り出し発現用ベクターに組み込み、(4)

得られた組換発現ベクターにより宿主細胞を形質転換して形質転換体を得、(5)この形質転換細胞を培養して、その培養上清から本発明のラットHGFを製造することが出来る。さらに形質転換細胞中の組換発現ベクターから制限酵素処理によって本発明のラットHGFをコードする塩基配列を含有するDNAを得ることが出来る。

以下、本発明の各工程について詳細に説明する。

(1) mRNAの単離とcDNAライブラリーの調製：

ラットのHGFをコードするmRNAはラット巨核球細胞、またはラット肝細胞などから得ることが出来る。例えば、*Biochemistry*, 18, 5294 (1979) に記載されているJ. E. Churgvinらの方法によって、ラット巨核球細胞、またはラット肝細胞のグアニジンチオシアノ酸溶液から得たRNAをさらにオリゴ(dT)セルロースカラムを用いる液相クロマトグラフィによって該mRNAを調製することが可能である。

また、ラット肝mRNAのような動物細胞や動物組織などの各種mRNAは市販品としてクロン

テック社などから購入して利用することも出来る。

これらのmRNAを酵型として逆転写酵素やボリメラーゼ・チーン・リアクション法 (PCR) を用いて、例えばK. Okuyamaらの方針 (Proc. Cell. Biol., 21, 161, 1982, およびMol. Cell. Biol., 3, 280, 1983) あるいはJ. Gullierらの方針 (Gene, 25, 203, 1983) あるいはK. A. Froehnerらの方針 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998, 1988) によってcDNAを合成し、このcDNAをプラスミドやファージなどに組み込むことにより、cDNAライブラリーを調製することが出来る。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしては、大腸菌由来のpBR322 (東洋紡績)、pUC18およびpUC19 (東洋紡績)、枯草菌由来のpUB110 (シグマ社)などがある。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、λgt10およびλgt11 (東洋紡績)などがある。これらのベクターは、宿主細胞内に保持されて複製、増殖されるものであれば、ここに例示したものに限定されるものではない。

mRNAを酵型として合成されたcDNAをプラスミドまたはファージに組み込んでcDNAライブラリーを調製する方法として、T. Maniatisの方法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 239) またはT. V. Lymanらの方法 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985) を各々例示することが出来る。しかし場合によっては、mRNAと同様に各種のcDNAライブラリーを市販品としてクロントック社などから購入する所以でそれらを利用することも出来る。

#### (2) cDNAライブラリーのスクリーニング：

cDNAライブラリーとして得られたプラスミドやファージなどの組換ベクターは、大腸菌のような適切な宿主細胞に保持される。宿主となり得る大腸菌としては、例えば*Escherichia coli* N.M. 514, C600 (ストラタシーン社)、NM 522, JM101 (ファルマシア社)などを例示することが出来る。cDNAのベクターがプラスミドの場合、塩化カルシウム法、あるいは塩化カ

ルシウム・塩化ルビジウム法、またcDNAのベクターがファージの場合、インビトロパッケージング法などを用いてあらかじめ増殖させた宿主細胞に保持させることが出来る (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 249)。

このようにして得られた形質転換体から、ラットHGFの部分のアミノ酸配列をコードするオリゴスクレオチドを合成し、このオリゴスクレオチドを<sup>32</sup>P標識したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション法 (Gene, 10, 63, 1980)、ブラークハイブリダイゼーション法 (Science, 196, 180, 1977) などによってcDNAをクローンを釣り上げることが出来る。また、目的とするボリペプチドに対する抗体を用いて、標識抗体法 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985) によって、cDNAをクローンをクローニングすることも可能である。このようにしてクローン化された形質転換体は、ラット由来HGFの全アミノ酸配列あるいはその部分のアミノ酸配列をコード

する塩基配列を有する cDNA を含有している。

次に該当遺伝構体から常法 (recombinant cloning Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980) によってプラスミド型ファージなどの組換 DNA を単離し、そのまま、あるいは核酸酵素で消化してから cDNA 塩基配列が決定される。得られたラット由来 HGF の cDNA の塩基配列は、マクサムとギルバートの化学法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560, 1977) やサンカーのジテオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5462, 1977) などによって決定される。さらに、必要があれば、記述の mRNA と塩基配列の決定された cDNA の 1 部あるいは cDNA の 1 部の合成 DNA をプライマーにしてプライマーエクステンション法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 731, 1979) によって新たに cDNA を合成し、上記と同様にして cDNA ライブライマーから第 1 の cDNA に連結した第 2 の cDNA を含有するプラスミドやファージなどの組換 DNA をクローニングすることが可能である。このプライマーエクステ

ンニングとクローニングの工程は、必要により複数回を返される。

#### (3) ラット HGF 組換発現ベクターの構築

クローン化されたラット HGF のアミノ酸配列の全部あるいはその一部をコードする cDNA を含有する数種のプラスミドやファージなどの組換ベクターから核酸酵素によって cDNA を切り出し、ラット HGF の発現に適したベクターのプロモーターの下位に断端酵素と RNA リガーゼを用いて再結合して組換発現ベクターを作製することが出来る。

より詳しくは、本発明のラット HGF を効率良く発現させるために組換発現ベクターは転写の方間に順番に (1) プロモーター、(2) ポリポリーム結合部位、(3) 開始コドン、(4) 本発明のラット HGF をコードする塩基配列を含有する DNA、(5) 終止コドン、(6) ターミネーターを含むように構築される。

本発明で用いることが出来る DNA のベクターとして、大腸菌由来のプラスミド pBR322、pUC18 (東洋紡績)、枯草菌由来のプラスミ

## 1-1

FpUB110 (ノグマ社)、酵母由来のプラスミド pRB15 (ATCC37062) あるいはバクテリオファージ λ E10、λ E11 (ストラタジーン社)、あるいはウイルス SV40 (BRL 社)、BPV (ATCC VR-703)、レトロウイルスの遺伝子由来のベクター、更にジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子を含むベクターなどが列挙出来るが宿主内で複製・増幅可能なベクターであれば特に限定はない。特に、本発明のヒト HGF を簡便に発現させるには、SV40 のようなウイルスの遺伝子由来のベクターを用いるのが好ましい。

例えば、前述のクローン化されたラット HGF をコードする DNA を SV40 ベクターの後期領域に結合した組換発現ベクターは、COS 細胞 (Cell, 23, 175, 1981) と呼ばれるサル細胞株に導入して発現させることが可能である。

プロモーターおよびターミネーターに関しては、目的とするラット HGF をコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特

## 1-2

に限定はない。例えば、プロモーターとして、宿主が大腸菌である場合、lacZ プロモーター、lacZc プロモーターなどを、宿主が枯草菌である場合、SPC1 プロモーター、SPC2 プロモーターなどを、宿主が酵母である場合、GAP プロモーター、PCK プロモーターなどを、宿主がマウス線維芽細胞やチャイニーズハムスター肺葉細胞のような動物細胞の場合、ウイルス由来の SV40 プロモーター、HSV1-TK プロモーターなどを示すことが出来る。またターミネーターとしては、宿主が大腸菌の場合、lacP ターミネーター、lacZ ターミネーターなどを、宿主が枯草菌の場合、lacZYF ターミネーターなどを、宿主が酵母の場合、CYC1 ターミネーターなどを、宿主が動物細胞の場合、SV40 プロモーターや HSV1-TK プロモーターあるいはメタロチオネインプロモーターやヒートショックプロモーターなどを示すことが出来る。これらのプロモーターとターミネーターは用いる宿主に応じて適宜に組み合わされる。

## 1-3

## 1-4

本発明のラット HGF をコードする塩基配列を含有する cDNA は、その cDNA が発現されるオペレーターが、肝実質細胞増殖活性を有するならば第 2 図に示した塩基配列に限定するものではなく、塩基配列の一部が置換、欠損、挿入、あるいはこれらが組み合わされた塩基配列を有する cDNA であってもよい。本発明のラット HGF をコードする塩基配列を含むする様 cDNA の翻訳開始コドンとして ATG、翻訳終止コドンとして TAA、TGA、あるいは TAG を有してもよい。また必要に応じて開始コドン、あるいは終止コドンを 1 つ以上組み合わせたり、他のコドンと組み合わせて配列してもよく、これらに特に限定はない。さらに、この組換発現ヘクターで形質転換した宿主の選択マーカーとなり得るアンビンリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子など 1 種または 2 種以上が該ヘクターの適切な位置に含有されていることが好ましい。

(4)宿主細胞の形質転換とその培養：

このようにして用意されたラット HGF 組換発

現ヘクターは、コンビナント細胞法 (J. Biol. Chem., 256, 1571, 1981)、アロトゲニスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978)、ウシ細胞カルシウム法 (Science, 221, 53, 1983)、D.E.A.B.E.キメララン法 (Science, 215, 185, 1982)、電気パルス法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7161, 1984)、インヒトロバクテージング法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975)、ウイルスヘクター法 (Cell, 37, 1053, 1984)、またはマイクロインジェクション法 (Exp. Cell. Res., 103, 347, 1976) などによって宿主に導入され、形質転換体が作製される。このとき、宿主として既述の大腸菌の他に、枯草菌、酵母および動物細胞などが用いられる。特にマウス線維芽細胞 C 32 T (J. Virol., 25, 291, 1978) やチャイニーズハムスター肺細胞 C H O (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216, 1980) などの哺乳動物由来の宿主細胞を用いるのが好適である。

得られた形質転換体は、目的とする組換ラット HGF を産生させるためにその宿主に応じた適切

## 15

な培地中で培養される。培地中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、血清および薬剤などが含有される。培地の 1 例としては、形質転換体の宿主が大腸菌の場合、LB 培地 (日本製薬) M 9 培地 (J. Exp. Biol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972, p. 431) などを、宿主が酵母の場合、YEPD 培地 (Genetic Engineering, vol. 1, Plenum Press, New York, 1978, p. 117)などを、宿主が動物細胞の場合、20%以下のウン胎児血清を含有する MEM 培地、D MEM 培地、RPMI 1640 培地 (日本製薬)などを挙げることが出来る。形質転換体の培養は、通常 20℃～45℃、pH は 5～8 の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。また、宿主が接着性の動物細胞などの場合は、ガラスピーズ、コラーゲンピーズ、あるいはアセチルセルロースフォローファイバーなどの担体が用いられる。これら以外の培地組成あるいは培養条件下でも形質転換体が生育すれば実施でき、これらに限定されるものではない。

## 16

い。

(5)ラット HGF の精製：

このようにして形質転換体の培養上清中または形質転換体中に生成した組換ラット HGF は、公知の塩析法、培養液濃法、透析法、薄層過過法、ゲル電気泳動法、あるいはゲル通過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィなどを組み合せて分離精製することが出来る。特に、硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、ペルリジセファロースアフィニティクロマトグラフィ、およびフェニルセファロース逆相クロマトグラフィの組み合わせ、あるいは硫酸アンモニウムによる塩析法、S-セファロースイオンクロマトグラフィ、および抗 HGF 抗体セファロースアフィニティクロマトグラフィの組み合わせなどが好ましく有効な精製法である。

以上述べた方法によって得られた新規な組換ラット HGF は、ラット肝およびラット血小板由来

HGFと同様にラット肝実質細胞の増殖を顯著に促進する活性を示した。

(HGF活性の測定)

HGF活性は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7229 (1983) に記載の方法に準じて次のとおり測定した。カイスター系ラットからコラーゲン環式法によって肝実質細胞を分離精製した。得られたラット肝実質細胞を5%ウシ血清、 $2 \times 10^{-5}$  Mインスリンおよび $2 \times 10^{-5}$  Mチカミサジンを添加したヒリアムスE培地(フローラボラリース社)に懸液し、24ウェルマルチプレートに $1.25 \times 10^4$  個/ウェルの濃度で播いた。5% CO<sub>2</sub> および30%O<sub>2</sub> および6.5%N<sub>2</sub> の存在下、37℃で20時間培養後、0.1μg/皿のアプロチニンを添加したヒリアムスE培地に交換すると同時に所定量の被験試料を添加した。1.5時間後、1.5μCi/皿の<sup>3</sup>H-デオキシウリジン $10 \mu\text{M}$ /ウェルを添加した。コントロール群には、<sup>3</sup>H-デオキシウリジン添加の15分前に5μg/皿のアフィディコリンを添加した。さら

に2時間培養して一回洗うとした。細胞を叶 $0.45 \times 10^{-5}$  S<sup>2</sup> 2回洗浄後、左心腔よりウシ筋膜水溶液(7.5%AA)で固定した。細胞をウエル盤たり0.5mmの1N水酸化ナトリウム液で可溶化し、その放射能をカシマカウンターにより測定した。また放射能測定後の試料の1部をコントローラー法 (J. S. et. Chem. 123, 265, 1951) に従い蛋白量を測定した。被験試料を添加したとき肝実質細胞蛋白質(相当たりに換算して、DNA合成活性(ミクロン/ミクロン蛋白質)とした。被験試料のHGF活性は、同一試験において上皮細胞成長因子(EGF): 1.0 μg/皿を用いた時の肝実質細胞のDNA合成活性の5.0%に相当する活性を1単位と定義して表示した。

(発明の効果)

本発明によれば、肝実質細胞の生体外での増殖を可能とする新規な生産活性ペプチドが提供される。本発明の組換ラットHGFは、臨床基準試薬

19

として有用である。さらに本発明の組換ラットHGFの作用により増殖維持される肝実質細胞は、例えば肝機能の基礎的研究用、肝実質細胞に対する各種ホルモンや薬剤の作用の研究用、肝癌の発癌研究用、あるいは肝炎ウイルスの生体外培養のための宿主細胞として極めて有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例)

実施例1

(1)ラット肝臓RNAの収穫:

ラット肝臓RNAは、グアニジンチオシアノ酸( *Biochemistry*, 18, 5294, 1979)によって抽出し、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408, 1972)によって精製して調整した。市販食用植物油で希釈した2.0%四塩化炭素をSDラット100g当たり1mlを腹腔内投与した。四塩化炭素投与の10時間後、肝臓を摘出した。得られ

20

たラット肝臓0.5gに5.5Mグアニジウム液(5.5Mグアニジンチオシアノ酸、2.5mMクエン酸、0.5%ラウラルザルコンシナトリウムからなるpH7.0の溶液): 5mlを加えてホモジナイズした。0.1M EDTAを含むセシウムトリフロロ酢酸溶液(1g/ml)17mlに上記のラット肝分散液16mlを重層し、ベックマン超遠心機、16-55型によって85000×g、22時間、20℃の条件下で遠心分離した。DNA層を除去した後、沈降したRNA層を1mlの蒸留水に溶解した。このRNA水溶液から冷エタノール沈澱によって6.24mgのRNAを得た。得られたRNAを1mM EDTAを含む: 0.5Mトリス塩酸緩衝液、pH7.5(以後TE緩衝液と略す)、0.5Mに溶解し、65℃、5分間、加熱処理した後、1M NaCl 0.5mlを加えた。0.1M NaOHで活性化した後、0.5M NaClおよび1mM EDTAを含む1.0mMトリス塩酸緩衝液(STE緩衝液と略す)で平衡化したオリゴdTセルロースカラムにRNA溶液0.5mlを注入し

た。約5μgのS-T-E緩衝液で洗浄後、T-E緩衝液で吸着したボリ(A)RNAを検出した。このボリ(A)RNAはS-CDEから冷エタノール沈殿で得られたボリ(A)RNAは、再びT-E緩衝液で溶解し、1.0μg/mlの濃度に調整した。

(2)ラット肝由来のcDNAライブラリーの作製  
上記(1)で得られたボリ(A)RNA、S-CDEを試型としてcDNA合成システム・プラス(アマシム社)を用いてGeblerらの方法(Gene, 23, 263, 1983)に準じてcDNAを合成した。1本錠cDNAの収量は、1.018ng、2本錠cDNAの収量は、1.729ngであった。この2本錠cDNAは、フェノール/クロロホルム(1:1, v/v)抽出とエタノール沈殿によって精製した後、S-T-E緩衝液で溶解し、約0.7μg/20μlの濃度に調整してから使用するまで-20℃で保存した。このcDNAは、cDNAクローニングシステムメモリ(アマシム社)を用いてHayahらの方法(DNA Cloning 1, a practical approach, 1, 49, 1982)に準じ、次のようにメモリ

## 2.3

大腸菌を用いたタイトレーションにより測定したcDNA 1.0ngから得られた組換ファージ数は、 $5.0 \times 10^4$  個であった。このようにして作製したcDNAライブラリー(1)は、使用するまで少量のクロロホルムを加えたSM緩衝液(100mM NaCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>、および0.01%ゼラチンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.5)中、4℃で保存した。

## ③DNAプローブの合成：

特願昭63-3311866号公報に記載のラットHGF-B鎖N末端アミノ酸配列15個をコードする塩基配列を確定し、オリゴヌクレオチド  
5' ACCATCCATCCTACCTGCT :  
TGCTCTGGTATCCCTTACIA  
3' (1はイノシンを表す)

をDNAシンセサイザー381A(アプライドバイオシステムズ社)により合成した。得られたオリゴヌクレオチドをT4ボリヌクレオチドキナーゼ(東洋精機)を用いて(<sup>32</sup>P)ATP(アマシム社)により標識してDNAプローブを作製

してこのE. coli R1菌株にクローニングした。E. coli R1リガーゼを用いて上記のcDNA添付で200μgを合成した後、E. coli R1リガーゼを用いてこのAの酵素端にE. coli R1リガーゼを用いた。過剰のリンカーベビックR1消化し、約1.0μgの反応液を得た。S-T-E緩衝液で平衡化したS-CDE精製用ガルバニムに上記反応液1.0μgを注入した。S-T-E緩衝液で洗浄してcDNA収量5.00μgを算めた。常法によってエタノール沈殿を2回繰り返した後、減圧乾燥してリンカーベビックR1消化した。再び、S-T-E緩衝液に溶解して5.0ng/μlのリンカーベビックR1消化液を得た。あらかじめ準備されたメモリ(1.0アーム1.0ml)にリンカーベビックR1消化液0.1μlをT4cDNAリガーゼを用いて挿入した。この反応液は冷エタノール処理した後、軽く乾燥し、得られた組換cDNAの全量を5μlのT-E緩衝液に溶解した。この組換cDNAをインピトロパッケージング反応に供し、メモリ10組換ファージを得た。ファージブリーティング用

## 2.4

した。

## (4)ラットHGF遺伝子cDNAの単離とその塩基配列の決定

上記(2)で得られた約 $5 \times 10^4$  個の組換ファージを3.7℃で15分間約8×10<sup>3</sup> 個の大腸菌NM514(ストラタジーン社)に感染させた後、約5.0℃で加温した0.7%の寒天を含むLB培地27.0mlに添加し、2.3cm×2.3cmのLB寒天培地プレート6枚に均一に液化した。空気中、3.7℃で1.2時間培養後、ブラークの生じたプレート上にニトロセルロースフィルターを約30秒間密着させた。このニトロセルロースフィルターを1.5M NaClおよび0.1N NaOHからなるアルカリ溶液に5分間浸漬し、さらに0.2M トリス塩酸緩衝液(pH7.5)、2.5mMリン酸緩衝液(pH7.5)、2.0M EDTAおよび2×SSC緩衝液からなる中性溶液に5分間浸漬した。直後、E. coli、2時間熱処理してニトロセルロースフィルターに各ブラークのcDNAを固定化した。得られたニトロセルロースフィルターは、E. coli

SDS 蛋白液、5×テンhardt 液液、5.0 mM EDTA、PMSF、および 1.0 mM 脲酸銅液、pH 7.0、などを用いてイブリダイゼーション液液に複合し、0.5 度で 20 時間前処理した。1.0 度で 20 分間熱処理した上記の SDS 蛋白液液合流オリゴヌクレオチド（約  $3 \times 10^6$  cpm）プローブと大鼠脳 RBC 1 cDNA (0.1 μg/μl) の混合液液を添加し、4 度で 16 時間ハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、ニトロセルロースフィルターは 0 度で 0.1% SDS を含む E×SSC 蛋白液液によって 3 回洗浄してから風乾した。このニトロセルロースフィルターを倍塗スクリーン、ライトエンダグラス（デニボン社）と X 線フィルム、RX (富士写真フィルム) に密着させ、-80 度で 30 時間露光した。得られた 3 個の陽性ブレーカーを採取し、上記と同じ方法によって 2 次スクリーニングを行い、得られた 1 個の陽性クローニングを RBC 1 cDNA と命名した。この RBC 1 cDNA を常法により増殖させ、RBC 1 cDNA を単離精製、制限酵素、切削解析および塩基配列解析に供した。得られた cDNA

の塩基配列は、シーケンサー（ニハイテッド・スチーラー・ハイオケミカル社）を用いてジオキシ化によって決定した。第 1 図は RBC 1 cDNA の制限酵素地図、第 2 図は RBC 1 cDNA の塩基配列を示す。RBC 1 cDNA は、ラット RBC 1 cDNA をコードする塩基配列（1 番目から E 979 番目）を含有する。つまに RBC 1 cDNA に含有する「AAATGCTCCATATTCCTGCTC」の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA シンセサイザー-3.6 kA (アブライドバイオシステムズ社) により合成した。この合成 RBC 1 cDNA をプライマーとし、(I) で調製したラット mRNA 2.0 μg を酵母として cDNA 4.0 μg を合成し、同様にして cDNA ライブライマー (E) を調製した。cDNA 1 μg から  $2 \times 10^6$  cpm の組換えファージを得た。マルチプライム DNA 検出システム（アマシム社）を用いて  $\alpha^{32}P$ -dCTP で標識した特開平 1-142697 号記載の HAC 1 S cDNA (その制限酵素地図は第 3 図に示す通りである) の 0.3 kb

Eco RI 断片をプローブにして、cDNA ライブライマー (I) の 1 次スクリーニングおよび 2 次スクリーニングを行ない、陽性クローニング RAC 3 を得た。RAC 3 ファージから常法により単離・精製した RAC cDNA を制限酵素切削解析および塩基配列解析に供した。第 3 図は RAC 3 cDNA の塩基配列を示す。このようにして得られた RBC 1 cDNA および RAC 3 cDNA の塩基配列を組み合わせたラット HGF のコード領域の全塩基配列およびその塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を第 4 図に示す。ラット HGF の全 cDNA 塩基配列から、ラット HGF の断続開始コードは 1 番目の ATG であり、終止コードは 218 番目の TAA と推定される。これらの開始および終止コードの間のラット HGF の cDNA 塩基配列は 728 アミノ酸残基からなるボリペプチドをコードし、1 番目の Met に続くアミノ酸配列は Leu に富み、30 番目の ATG までが HGF 分泌のためのシグナル配列と推定される。ラット

HGF の N 末端は、ラット HGF の N 末端のアミノ酸配列の解析から 56 番目の Pro と推定される。同様に、ラット HGF の N 末端は、456 番目の Val である。またラット HGF の總合の結合部位は、Ala-x-Ser/Thr のアミノ酸配列を有する 295 番目、403 番目、E 979 番目、および 636 番目の Asp と推定される。

第 4 図に示すラット HGF のアミノ酸配列をコンピューターによりオモロジー検索を行った結果、ラット HGF はプラスミノーゲン、プラスミン、カリキュレインや凝固因子 X などのセリンプロテアーゼとホモロジーを持つことが見出された。即ち、ラット HGF はその C- 端にクリンダル構造と推定される配列を 4 個所持つおり、またその F- 端は上記セリンプロテアーゼのプロテアーゼ領域に類似している。しかし、セリンプロテアーゼの活性中心と推定されている Ser と His がラット HGF の F- 端では Tyr (E 76 番目) と Glu (535 番目) にそれぞれ置換されてい

る。

(5) サルCOS細胞用ヒトHGF発現ヘクターの構築

サルCOS細胞用ヒトHGF発現ヘクターをSHK (r HGF 1) の構築区を、第5図に示す。上記(4)で得られたRAC 3 ファーンのDNAを制限酵素Bgl IIとXba Iで消化し、アガロース電気泳動により0.7 kbのDNA断片を分離精製した。制限酵素Bgl IIとXba Iであらかじめ消化したブルースクリプトSKM 13+ (ストラタジーン社) と0.7 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼにより結合してプラスミドpBSR H 2を得た。また別にRAC 3 ファーンのDNAを制限酵素Xba IとEco RIで消化し、アガロース電気泳動により0.4 kbのDNA断片を分離精製した。制限酵素Xba IとEco RIであらかじめ消化したブルースクリプトSKM 13+と0.4 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼにより結合してプラスミドpBSR H 2を得た。このプラスミドpBSR H 2をEco RIで消化

し、耐塩性アルカリファスファターゼ (BAP) でリン酸基を除去した部位に、上記(4)で得られたRAC 3 ファーンのDNAを制限酵素Bgl IIで消化して、得られたSHKとBSR H 2断片をT4 DNAリガーゼによって接合しプラスミドpBSR H 3を得た。次に、プラスミドpBSR H 3を制限酵素Xba IとXba Iで消化し、アガロース電気泳動により0.7 kb DNA断片を分離精製した。同様にプラスミドpBSR H 3を制限酵素Xba IとBam HIで消化し、1.8 kb DNA断片を分離精製した。制限酵素Xba I、Bam HIであらかじめ消化したブルースクリプトSKM 13+ (ストラタジーン社) と0.7 kb DNAおよび1.8 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼにより結合してプラスミドpBS (r HGF 1) (株工研富士第11051号)を得た。得られたpBS (r HGF 1) を制限酵素Xba IとBam HIで消化し、2.5 kb DNA断片を得た。制限酵素Xba IとBam HIであらかじめ消化した細胞用発現ヘクターpEUK-C1 (クロンテ

## 3 1

ック社) と2.5 kb DNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼで結合してラットHGF発現ヘクターpEUK (r HGF 1)を得た。

(6) サルCOS細胞の形質転換とラットHGF遺伝子の発現：

得られたpEUK (r HGF 1) プラスミドをエタノール沈殿した後、10 mM PBS緩衝液に溶解し、20 μg/mlに調整した。次に、10%ウシ胎児血清(ギブコ社)を含むL MEM培地(日本製薬)中で増殖させた対数増殖期のCOS-1細胞(ATCC CRL-1650)を10 mM PBS緩衝液で2回洗浄した後トリブシン処理した。同様緩衝液で3回洗浄後、細胞濃度2×10<sup>6</sup>個/mlになるように再び同緩衝液に浮遊化した。先に調整したプラスミド溶液250 μlと細胞浮遊液250 μlを混合し、冰浴下で10分間放置した。この氷冷したプラスミド・細胞混液に高電圧パルス導入装置ZA-1200 (PDS社)を用いて、印加電圧4 kV/cm、パルス時間20ミリ秒の条件下で高電圧パルスをかけた。得

## 3 2

られた細胞を上記の培地で希釈し、37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下にて3日間培養した。培養3日目の培養上清中のHGF活性を前述のラット肝実質細胞を用いて測定したところ、3.2単位/mlであった。一方、HGF cDNAを挿入していない発現ヘクター、pEUK-C1を同じ方法によりCOS-1細胞に導入して培養したが、その培養上清中には、HGF活性を認めなかった。

## 実施例2

(1) マウスC127細胞用ラットHGF発現ヘクターの構築

マウスC127細胞用ラットHGF発現ヘクターpBPM T (r HGF 1) の構築区は、第6図に示す。プラスミドpBPM Tを制限酵素Eco RIで消化後、耐塩性アルカリファスファターゼ (BAP) でリン酸基を除去した部位に、実施例1で得られたプラスミドpBS (r HGF 1) を制限酵素Xba IとBam HIで消化しT4 DNAリガーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した2.5 kbのDNA

断片を T4 DNA リガーゼにより挿入した。得られたラット HGF 発現ベクター pBPM T (r HGF 1) は、MT-1 プロモーターと SV40 初期遺伝子のポリ (A) 付加シグナルの間にラット HGF 遺伝子を有し、この発現ベクターによるマウス C127 細胞の形質転換は、ウシバジロマウス (BHK) により可能となる。また形質転換された細胞の選択は、トランスポンタ E5 の neo 遺伝子 (Gene, 19, 327, 1982) にヘルペスシンブレックスウイルスタイプ 1 のチミジンキナーゼ (HSV-1-TK) 遺伝子由来のプロモーターとポリ (A) 付加シグナルを連結した rHGF キメラ遺伝子によって可能となる。

(2)マウス C127 細胞の形質転換とラット HGF 遺伝子の発現：

ラット HGF 発現ベクター pBPM T (r HGF 1) は、Wigler らの方法 (Cell, 11, 223, 1977) によりマウス C127 細胞へ導入した。

上記(1)で得られた 2.0  $\mu$ g の pBPM T (r HGF 1) プラスミドを 2.40  $\mu$ g の 0.5 M 塩化

カルシウム 2.40  $\mu$ g に溶解し、0.05 M HEPES, 2.00  $\mu$ M DNase (amplification grade) の酸ナトリウムからなる 2  $\times$  HEPES 濃縮液 (pH 7.1) 、2.40  $\mu$ g を複数しながら加えた。室温で 3.0 分攤拌を続けプラスミドとリン酸カルシウムの共沈液を蒸成させた。あらかじめ、1.0 M リン酸鈉緩衝液 (ギブコ社) および 0.5 M グルタミンを添加した DMEM 培地 (日本製薬) を用いて  $\times$  1.5 倍の C127 細胞を 5% CO<sub>2</sub> の存在下で 3.7 ℃、2.4 時間培養した。培地交換した後、プラスミドとリン酸カルシウム共沈液を加え、室温で 2.0 分攤拌した。さらに 3.7 ℃で 4 時間インキュベートした後、培地を除去し、1.5% グリセリンを添加した 1  $\times$  HEPES 濃縮液を加え室温で 5 分攤拌した。培地で細胞を洗浄した後、培地交換し、さらに 3.7 ℃で 2 日間インキュベートした。細胞を 10 倍に希釈して 1 倍/皿の C418 (シグマ社) を含む培地を用いて 5% CO<sub>2</sub> の存在下で 3.7 ℃、2 日間培養して形質転換細胞を得た。得られた細胞株から培養上清中の HGF

## 3.5

活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングしラット HGF 高産生株 BPR77 を得た。この細胞の培養上清中の HGF 産生能は、1.5 万単位/ml/日であった。

## 実施例 3

(1)チャイニーズハムスター CHO 細胞用ラット HGF 発現ベクターの構造：

チャイニーズハムスター CHO 細胞用ラット HGF 発現ベクター pEVMT (r HGF 1) の構造図は、第 7 図に示す。プラスミド pEVMT を制限酵素 EcoRV で消化後、絶縁アルカリフェヌスファターゼ (BAP) でリン酸基を除去した部位に、実施例 1 で得られたプラスミド pBS (r HGF 1) を制限酵素 XbaI と BamHI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端とした後、アガロース電気泳動により分離・精製した 2.6 kb の DNA 断片を T4 DNA リガーゼにより挿入した。得られたラット HGF 発現ベクター pEVMT (r HGF 1) は、MT-1 プロモーターと SV40 の初期遺伝子のポリ (A) 付加シ

## 3.6

ナルの間にラット HGF 遺伝子を有する。また、形質転換された細胞の選択は、マウス DHFR 遺伝子 SV40 初期プロモーターとポリ (A) 付加シグナルを連結したジヒドロ葉酸還元酵素キメラ遺伝子 (DHFR) により可能となる。

(2)チャイニーズハムスター CHO 細胞の形質転換とラット HGF 遺伝子の発現：

ラット HGF 発現ベクター pEVMT (r HGF 1) は、実施例 2 と同様にしてチャイニーズハムスター CHO 細胞の DHFR 欠損 CHO-DUKX 細胞に導入した。得られた細胞株は、リボスクレオシドとテオキシヌクレオシドを含まず、透析した 1.0% ウシ胎児血清 (ギブコ社) と 1% グルタミンと 5.0 nM メソトレキセートを含む DMEM 培地 (フローラボラトリーソ) を用いて、培養上清中の HGF 活性の高い細胞を限界希釈法でスクリーニングした。発生したコロニーは、安定なラット HGF 高産生株を得るために、培地において 7 世代まで増殖させた。その結果、安定なラット HGF 高産生株 EVR26 を得た。この

細胞のラットHGF産生能は、2.5万単位/L/日であった。

#### 4. 図面の簡単な説明

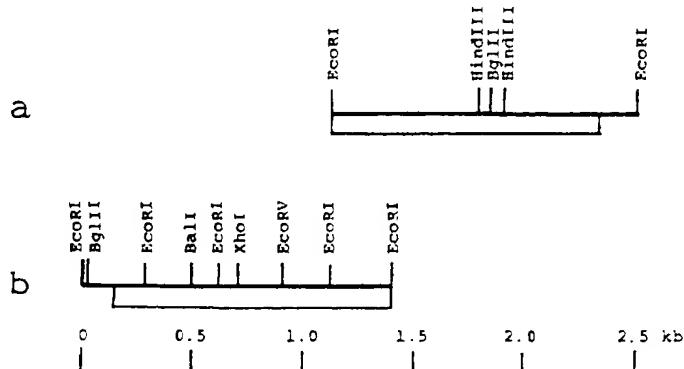
第1図は、RBC1 cDNAの制限酵素地図版(a)およびRAC3 cDNAの制限酵素地図版を示す。第2図は、RBC1 cDNAの塩基配列の例及びRAC3 cDNAの塩基配列の例を示す。第3図はRAC1 cDNAの制限酵素地図を示す。第4図は、ラットHGFコード領域の全塩基配列とアミノ酸配列を示す。第5図は、サルCOS細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。第6図は、マウスC127細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。第7図は、チャイニーズハムスターCHO細胞用ラットHGF発現ベクターの構築図を示す。

特許出願人 東洋紡織株式会社

代理人 弁理士 高島



39



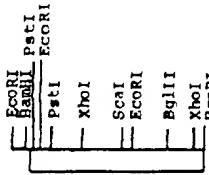
第1図

第2回 - 2

GAATT CCTTTCAC GTTGGATC GCGTACCC	481	AG ATCTTCAG	121
CACAGCAT ACATCCTC CGAGATTC MACTAGAG ACCTTAAGA AATTTATTC	421	TTAACAC ACACAACTT CCTTACCGA ATTAAGCCG CCTACACCG AGCGCTTC	61
GCATACCG ATGGGCTTA ATGACATTC TTTTACCA CTTGACCA CTCGCAAGTT	361	ACAGGATC TTTCACCG GCTCTTCG CAGAGATC AGCGCTTC AGCTCTCG AGCTGAACTC	1
TTTACTCT CTCAATTCC CAATGTCG CTTCAGTCG GCGAGATC TTATCTGGC	301	ATGATGGG GCAACACTT TCTGGATC CTGTCGTC AGCTGCTC AGCTGCTC	60
ATGGGAA ACTTCATGG CAACTTCG MACTAGCTC MACTAGCTC AGCTGCTC	241	CTGCTTCG CTGTCGACG CCTCTACG GAGGACAGA AGAGAGAG AGAGACTCTT	120
TTGGACAGA ATGACAGA TTGACGCTT CATATCTCT CCTGACAGA CCTGACAG	181	CATGATCA AAATGAGC AAGAGCTC AAGAGCTC CCTAACAGA AGACGCTT AGCTGAACTT	180
TTGACTGA ATTTCTGG GAGGCGAT GAGGCGAT ATGAGCTC ATGCTACAA	121	AAACCAAA AGCTGCTC TCGAGCTG TCTGGATC GTCGACAG AAGACGCC	240
GGGATCTT TTCTCTTG CCTTATTCG GTTGGATG AGATACCA	61	TTGGATCA CTGAGGCG CTGTCGTTT GATAGCTG GAAAGCTG CTACCTGAT	300
CCTACATTC TCAATTGCA CCTACCTCA ATATCTCTG CAAACAAAGA AGACTGCA	1	CTTCTACAA GTATCTGAG TGGCTGAA AGAGCTTG GCGATGTTT TGAATCTAT	360
GTGCTTAATC GCAATCCAC ACAGACAA GAGGGAGT GGTCTCTG TCGAGGAA	60	GAAGACAG AG ATATTTAG AATTCCTC ATGGCTAC GAGCTGAGA TAAGGGATA	420
ATAAACACA TCTGGGGGTG ATCAGGATA MACTAGCTT GGTCTCTG TCGAGGAA	120	GTATGATCA CTGAGCTG TCAAGCTG CAGCTGAT CCTGGCTA ATTCTGAT CCGCTGAA	480
TTTTTCAG CTGAGACAA AGGTTGAA GAGCTTAA CCTGGCTG ATGCTCTG ATGCTAT	180	CACAGCTT TTGGCTGAG CTATGGCTG AAAGAGCTC AGGAAGCTA CCTGCTAT	540
GTCTGACAA GAGGGAGA GAGGCGAA CAGCTTAA AATTTGCA CCTGATCT	240	CTGGAGGG AGAGGGGG AGCTGCTG TTCAGCTGAA ATCGAGGT AGCTGAA	600
GGACCTGAG CCTGAGTTT GTTTCAGT GGTCTCTC GGTCTCTC AGTCTCTC	300	GTCTGAACTA TTCTGAGT TTCAAGCTG GAGCTGAT CCTACAGCA TGAAGCTC	660
TTTCTGATA CCTTCTTTT ACCTCTAT CCTCTACAA TCCCTGAA CCTACTTC	360	AGAGCTGCA TGGATCAG AGAGCTGAG AGAGCTCTG AGCGCTGAGA TTGAGCTCA	720
AGTATTTTG GGTGGGCTA CACTTATC ATGACAGC ATGTTTATTT AGACTACT	420	CCACAGGG AGACAGTTT GCGGAGAA TATGGAGA AGGGCTTG TGATATTT	780
CATCTTATA TTATGGGAA TCAAGATTC AGTACAGAC AGTACAGAC CCTGACTTC	480	TTGGGCTG CCTACGAA CCTGGCTA GCGAGGCA TTGCTGAGA CTGTCGACCC	840
ATGAGCTC MACTATTC TGGGCTAA AGCATGAA CAGGCTG TCGAGGAA	540	TTGGCTTT GTCGATTA AAATGGCTT CAGAGCTC TTGATGAGC TTGATGAGC	900
TATGGGGC CACTCTTT TCAAGACG AAGATGAA TGTCTCTG TTCTATTT	600	ATGAGCTAC CCTGATGAT MACTGAA CCTGGAGTT AGCGAGAC CAGCTAAC	960
CTCTGCTG GAGTGGCAT OCCTGATTT TTGTCGAGT AGCTATTT	660	TTTGGCTG GAGTGGCT GAGCTGTT CCTGGCTG AGCTGCTG AGCTGCTG	1020
GCAGAATGAA TMAAGAGT AATTTGACA TACAGTTT AATACGAA GAGGGAGCA	720	ACTGGGAGA ACTCTTACG AGAGGAGTT AGAGGAGTT ATGGGAGA TTGGGAGG	1080
GTCTTATAA AGGCTCTT GATACGAA GATTCGAG ACTTCGAG TAAATGCA	780	CTGCTGAC AGCTGTTT TACGCTGAT CCTACCTG GAGTGGTT CCTCTCTAA	1140
CTTAAACAA TCTTAAACAA ACTACTGG TGTGCTGT GTCGAGATC CCTTATTT	840	ATTCCAAAT CTGAGCTTC AGCTGAGCA CCTTCTTAC GTCGAGTC GAGAGACTC	1200
ATGTCGGTT TTCTCTGAA AAGAAAGAA AAGAAAGAA TTC		ATGGGAGT TATGAAACG AAGTGGAA CCTGAGCTT CCTGGCGA CAGCTATG	1260
		GGAGGATT	

## 図3-4 [32](1)

ATC ATG TGC GGC ACC AAA CTT CTC GCG GTC GTC TTC CTC CAG CAT GTC 48  
 Met Met Trp Gly Thr Lys Leu Leu Pro Val Leu Lys Ile His Val 15  
 1 5 10 15  
 CTC CTC GAC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC ACC ATC ACC TAT GCA GAA GAA 96  
 Leu Leu His Leu Leu Leu Pro Val Thr Ile Pro Tyr Ala Glu Gly 20 25 30  
 CAG AAG AGA 144  
 Gln Lys Lys Arg Arg Alan Thr Leu His Glu Phe Lys Ser Ala Lys 45  
 35 40 45  
 ACT ACT CTT ACC AAC GAA GAC GCA TTA GTC AAC ATT AAA ACC AAA AAA 192  
 Thr Thr Ile Thr Lys Glu Asp Pro Leu Val Lys Ile Lys Thr Lys Lys 50 55 60  
 65  
 GTC AAC TCT GCA GAT GAG TGT GCC AAC AGC TGC ATT ATG AAC AAC AAC GGC 240  
 Val Asn Ser Ala Asp Glu Cys Ala Asn Arg Cys Ile Arg Asn Lys Gly 70 75 80  
 85 90 95  
 TTT CCA TTC ACT TGC AAC GGC TTT GTT GAT ATG TGC ATT ATG TGC AAA GCA 288  
 Phe Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ser Arg Lys Arg 95  
 100 105 110  
 TGC TAC TGC TAT CCT TTC AAC ATG ATG TCA ATG GGA GTC AAA GGC 336  
 Cys Tyr Ile Pro Phe Asn Ser Met Ser Glu Ile Lys Gly Gly 115 120 125  
 TTT GGC CAT GAA TTT CAC CTC TAT GAA AAC AAC GAC TAT ATT AGA ATT 384  
 Phe Gly His Glu Phe Asp Ile Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn 130 135 140  
 145 150 155 160  
 TGC ATC ATT GGT AAA GGA GGC AGC TAT ATG GGC AGA GAA TCC ATC ACT 432  
 Cys Ile Ile Lys Gly Gly Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr 165 170 175  
 180  
 AGC ACT GGC ATC AAC TGC CAG CCT TGG MAT TCC ATG ATC GGC CAT GAA 480  
 Ile Ser Gly Ile Lys Cys Glu Pro Trp Asn Ser Met Ile Pro His Glu 185 190 195  
 200  
 CAC AGC TTT TTC CCT TCC ATC ATT GGC GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC 528  
 His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Ile Arg Ile Lys Asp Leu Glu Asn 205 210 215  
 220  
 TAC TGT CGA ATT CCT CGA GGC GAA GAA GAG GAA CCT TGC TCT TGC AGA 576  
 Tyr Cys Arg Alan Pro Arg Cys Glu Glu Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr 225 230 235  
 240 245 250



## 第3回

[ 1 kb ]

## 図4 図2(2)

## 図4 図2(3)

AGC ATT CCA GAC GTC CGC TAC GAA GTC ATT GTC ATT CGT GAC TGT TCA  
 Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Glu Cys Ser 624  
 195  
 200  
 GAA GTT GAA TGC ATT GTC AAC TGC AGC GGT GAA ATT GCA GTC ATT CGT GAA  
 Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asp Glu Ser Tyr Arg Pro Met 672  
 Asp His Thr Glu Ser Cys Lys Thr Cys Glu Arg Ile Asp Glu Thr 225  
 230  
 GAT CAC ACA GAA TCA GGC AAC ACA TGT CAA CGC TGG GAT CAG CAG ACA  
 Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Glu Phe 720  
 240  
 CCA GAC CGC CAC AAA TTC TGC GAA AGA TAT CCC GAC AAC GGC TTT  
 Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Glu Phe 768  
 245  
 250  
 GAT GAT ATT TAT TGC CGC ATT CCC GAT GGC AAC CGG GCA TGG TCC  
 Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Lys Pro Asn 816  
 260  
 TAC ACT CCT GAC ACC CCT TGC GAG TAT TGT GCA ATT AAA ATG  
 Tyr Thr Leu Asp Pro Asp Thr Pro Trop Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Met 854  
 275  
 280  
 TGC CCT TAC ACT CCT GTC ATT GAC ACT GAT GTT CCC ATG GAA ACA ACT  
 Cys Ala His Ser Ala Val Asn Glu Thr Asp Val Pro Met Glu Thr Thr 912  
 290  
 295  
 GAA TGT ATT GCA ATT GCA GAA GAA GAA ATT GCA ACC ACC ATT AAC ACC  
 Glu Cys Ile Lys Glu Glu Glu Glu Tyr Arg Glu Thr Thr Asn Thr 950  
 305  
 310  
 ATT TGG ATT GCA ATT GCG TCT GAG ATT TGG GAT TGG GAT TGG CCC GAC  
 Ile Pro Asn Glu Arg Thr Asp Ser Glu Tyr Pro His 1008  
 325  
 330  
 AGC CAT GAC ATC ATT GCG AAC TGC ATT GAA TGC ATT AGA GAA 1056  
 Lys His Asp Ile Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Asp Leu Arg Glu  
 340  
 345  
 ATT TAT TGC CGC ATT GCG GAT GGG ATT GCA TGG ATT GCA TGG ATT GCG  
 Asp Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Ala Glu Ser Pro Trop Glu Phe Thr 1104  
 355  
 360  
 ATT GAT GCA AAC ATC GCA ATT GCT GTC ATT GCA ATT CCC AAA TGT  
 Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Glu Tyr Cys Ser Glu Ile Pro Lys Cys 1152  
 370  
 375

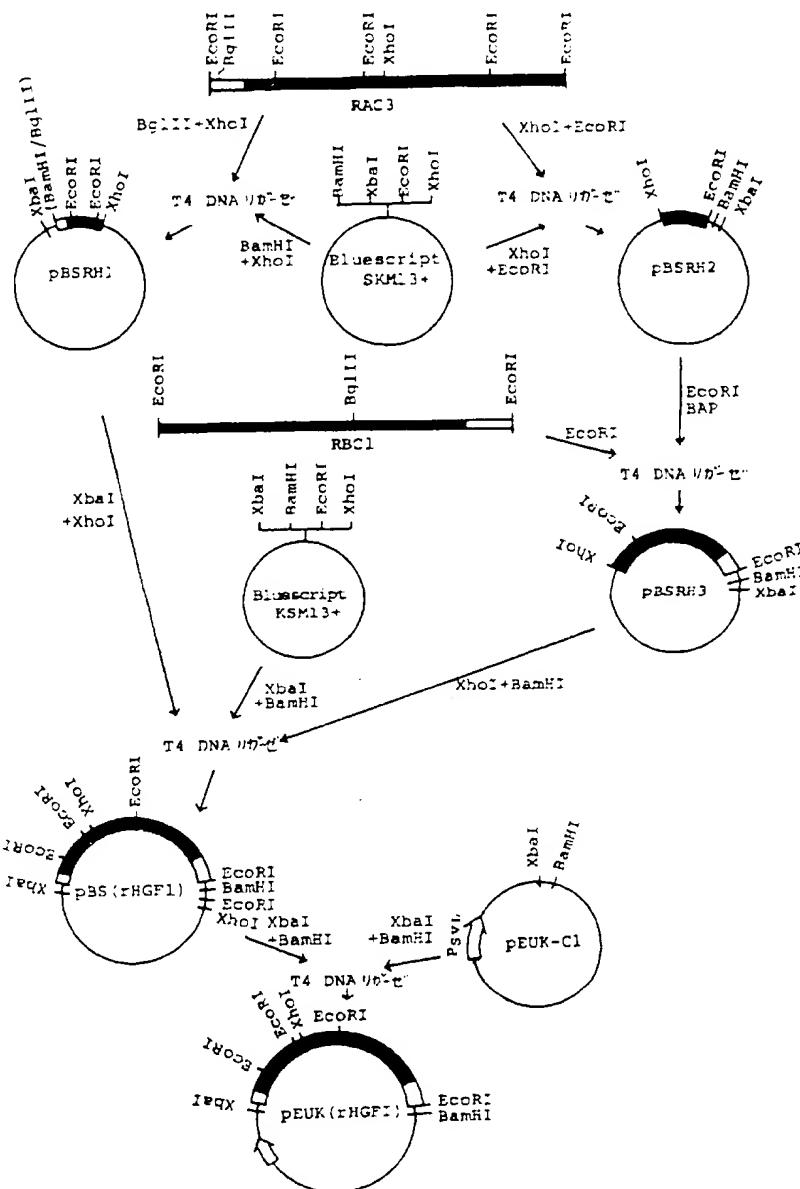
GAC GTT TCA ACT GGC CAA GAA GAT TGT ATT CCT GGC ATT GCA ATT GCA ATT  
 Asp Val Ser Ser Glu Cys Asp Cys Tyr Arg Lys Ile Asn Tyr 1200  
 385  
 390  
 ATG GGC AAC TTA TCC AAA ACA AGG TCT GCA CTC ACA TGT TCC ATT TGC  
 Met Glu Asn Leu Ser Lys Thr Arg Ser Glu Leu Thr Cys Ser Met Thr 1248  
 405  
 410  
 GAC AGG ATT ATG GAG GAT TTA CAC GAT CAT ATT TTC TGC GAG CCA GAC  
 Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trop Glu Pro Asp 1296  
 425  
 430  
 CCT ATC ATG TTG ACT ATG ATT TAC TGC CGF AAC CGC GAT GAC GAC CCC 1344  
 Ala Ser Lys Leu Thr Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala 440  
 445  
 CAT GCA CCT TGG TCC TAC ACA CGG ATT CCT CTC ATT CCT TGG GAT TAT 1392  
 His Ile Pro Trop Cys Tyr Thr Glu Asn Pro Ile Val Pro Trop Asp Ile 450  
 455  
 TGC CCT ATT TCC CCT ATT GAA GCA GAT ACT ACA CCT ACA ATT GTC ATT 1440  
 Cys Pro Ile Ser Asn Cys Glu Glu Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asp 465  
 470  
 475  
 TTG GAC CAT CCT GCA ATT TCC CCT ATT GGC AAA ACA ACA GAA GCA ATT CCT GCA ATT 1488  
 Leu Asp His Pro Ile Ser Cys Ala Ile Lys Thr Lys Glu Ile Asn Val 485  
 490  
 GTC ATT GGC ATT CCT GCA ACA ACA GCA GCA GCA ATT CCT ATT TGG ATT 1536  
 Val Asn Glu Ile Pro Thr Glu Thr Thr Val Glu Thr Met Ile Ser Ile 500  
 505  
 510  
 AAA TAC AGG ATT AAA CAC ATT CCT ATT GGC GCA TCA TGG ATT AAC GAA ATT 1584  
 Lys Tyr Asn Lys His Ile Cys Glu Glu Ser Ile Ile Lys Glu Ser 520  
 525  
 530  
 535  
 TTG GTC ATT ACT GCA AGG GAA ATT CCT ATT CCT ATT AAC AAC AAC AAC GAC TGG 1632  
 Val Leu Thr Ala Asn Cys Phe Pro Ala Arg Asn Lys Asp Ile 540  
 545  
 550  
 AAA GAC TAT GCA CCT CCT GCA ATT CCT ATT CCT ATT AAC AAC AAC AAC GAC TGG 1680  
 Lys Asp Tyr Glu Ala Ile Cys Glu Ile His Asp Val His Glu Asn Glu 560  
 565  
 TAC GAG AAA GGC AAA GAG ATT CCT ATT CCT ATT CCT ATT CCT ATT CCT ATT 1728  
 Glu Glu Ile Asn Ile Lys Glu Ile Asn Ile Lys Glu Ile Lys Glu Ile 570  
 575

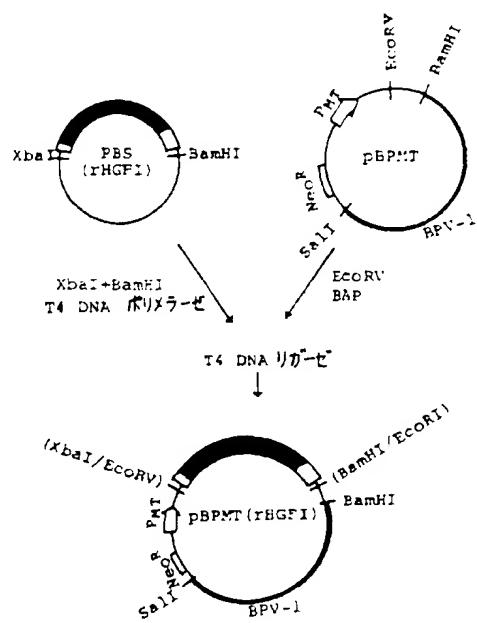
図4 図2(3)参照 &lt;

図4 図2(1)参照 &lt;

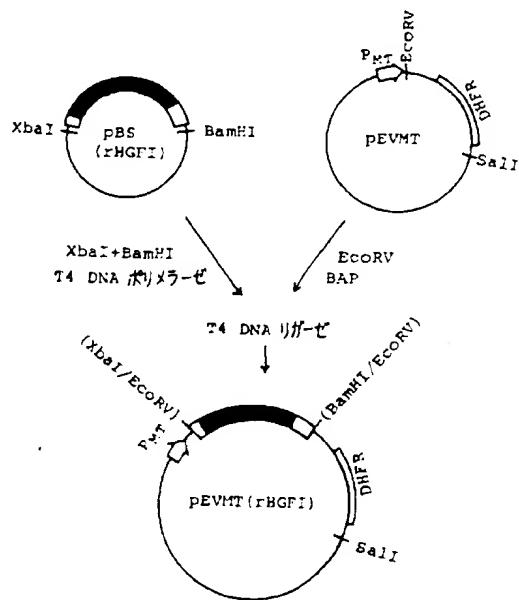
## 第4回(4)

CCT GAA GGC TCA GAT TTG GTT TTA CTC AAG CTT CCT CCC CCT GCA ATC 1776  
 Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Leu Lys Leu Ala Arg Pro Ala Ile  
 580 585 590  
 CTG GAT AAC TTT GTC AGT ACA ATT GAT TTA CCT AGT TAT GGC TGT ACA 1824  
 Leu Asp Asn Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Ser Tyr Gly Cys Thr  
 595 600 605  
 ATC CCT GAA AAG ACT ACT TGC AGT ATT TAC GGC TGG GGC TAC ACT GGA 1872  
 Ile Pro Glu Lys Thr Thr Cys Ser Ile Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly  
 610 615 620  
 TTG ATC AAC GCA GAT GCT TTA TTA CGA GTA GCT CAT CTG TAT ATT ATC 1920  
 Leu Ile Asn Ala Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met  
 625 630 640  
 GGG AAT GAG AAA TGC AGT CAG CAC CAT CAA GGC AAC CTG ACT TGC AAT 1968  
 Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gin His His Gin Gly Lys Val Thr Leu Asn  
 645 650 655  
 GAG TCT GAA TTA TGT GCT GGG GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCT TGT 2016  
 Glu Ser Glu Leu Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys  
 660 665 670  
 GAG GGA GAT TAT GGT GGC CCA CTC ATT TGT GAA CAA CAC AAA ATG AGA 2064  
 Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Cys Glu Gin His Lys Met Arg  
 675 680 685  
 ATG GTT CTT CCT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATC CCA AAT 2112  
 Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn  
 690 695 700  
 CCT CCT CCT ATT TTT GTT CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC 2160  
 Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His  
 705 710 715 720  
 AAA GTA ATT TTG ACA TAC AAG TTG TAA  
 Lys Val Ile Leu Thr Tyr Lys Leu \*\*\*  
 725





第6図



第7図

## 第1頁の続き

⑪Int. Cl. *	識別記号	序内整理番号
A 61 K 45/00		9051-4C
C 12 N 5/10		
	ZNA	
C 12 P 15/18	H	8214-4B
II A 61 K 21/00	ACS	8615-4C
	ADU	8615-4C
G 01 N 33/574	A	9015-2J
(C 12 P 21/00)		
C 12 R 1:91)		

⑫発明者 萩屋道雄 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内

⑬発明者 清水伸 滋賀県大津市堅田2丁目1番1号 東洋紡績株式会社医薬研究所内

⑭発明者 田代康介 福岡県福岡市東区筥松2丁目2-37 第2東寿荘205号室